

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification: C07K 14/52, C07K 1/13, G01N 33/533	A1	(11) International Publication Number: WO 00/12554 (43) International Publication Date: 09 March 2000 (09.03.2000)		
(21) International Application Number: PCT/FR99/02055 (22) International Filing Date: 27 August 1999 (27.08.1999) (30) Priority Data: 98/10827 28 August 1998 (28.08.1998) FR (60) Parent Application or Grant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [/]; O. UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (Paris VI) [/]; O. VITA, Claudio [/]; O. VIZZAVONA, Jean [/]; O. GLUCKMAN, Jean, Claude [/]; O. BENJOUARD, Abdelaziz [/]; O. VITA, Claudio [/]; O. VIZZAVONA, Jean [/]; O. GLUCKMAN, Jean, Claude [/]; O. BENJOUARD, Abdelaziz [/]; O. AUDIER, Philippe ; O.	Published			
(54) Title: METHOD FOR MARKED CHEMOKINE SYNTHESIS, MARKED CHEMOKINE AND ANALYSIS KIT (54) Titre: PROCEDE DE SYNTHESE D'UNE CHIMIOKINE MARQUEE, CHIMIOKINE MARQUEE ET TROUSSE D'ANALYSE				
(57) Abstract <p>The invention concerns a method for the homogeneous synthesis of a marked chemokine in a specific position. The invention also concerns a chemokine obtained by said method, a composition and a kit comprising said chemokine. The invention is characterised in the method for the synthesis of the marked chemokine comprises a step which consists in a solid phase chemical synthesis of the chemokine or a modified sequence thereof.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention se rapporte à un procédé de synthèse d'une chimiokine marquée de manière homogène en une position déterminée. La présente invention se rapporte également à une chimiokine obtenue par ce procédé, à une composition et à une trousse comprenant ladite chimiokine. Selon l'invention, le procédé de synthèse de la chimiokine marquée comprend une étape de synthèse chimique en phase solide de la chimiokine, ou d'une séquence modifiée de celle-ci.</p>				

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau International

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07K 14/52, 1/13, G01N 33/533	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/12554 (43) Date de publication internationale: 9 mars 2000 (09.03.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02055 (22) Date de dépôt international: 27 août 1999 (27.08.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/10827 28 août 1998 (28.08.98) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (Paris VI) [FR/FR]; 4, Place Jussieu, Tour Centrale, F-75252 Paris Cedex 05 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VITA, Claudio [FR/FR]; 28, allée du Bois de Gravelle, F-91190 Gif sur Yvette (FR). VIZZAVONA, Jean [FR/FR]; 479, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges-sous-Salève (FR). GLUCKMAN, Jean, Claude [FR/FR]; 70, boulevard de Port Royal, F-75005 Paris (FR). BENOUIARD, Abdelaziz [FR/FR]; 1, rue du quartier Parisien, F-94200 Ivry sur Seine (FR). (74) Mandataire: AUDIER, Philippe; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
<p>(54) Title: METHOD FOR MARKED CHEMOKINE SYNTHESIS, MARKED CHEMOKINE AND ANALYSIS KIT</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE SYNTHESE D'UNE CHIMIOKINE MARQUEE, CHIMIOKINE MARQUEE ET TROUSSE D'ANALYSE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for the homogeneous synthesis of a marked chemokine in a specific position. The invention also concerns a chemokine obtained by said method, a composition and a kit comprising said chemokine. The invention is characterised in the method for the synthesis of the marked chemokine comprises a step which consists in a solid phase chemical synthesis of the chemokine or a modified sequence thereof.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention se rapporte à un procédé de synthèse d'une chimiokine marquée de manière homogène en une position déterminée. La présente invention se rapporte également à une chimiokine obtenue par ce procédé, à une composition et à une trousse comprenant ladite chimiokine. Selon l'invention, le procédé de synthèse de la chimiokine marquée comprend une étape de synthèse chimique en phase solide de la chimiokine, ou d'une séquence modifiée de celle-ci.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Saint-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Description

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

PROCEDE DE SYNTHESE D'UNE CHIMIOKINE MARQUEE,
CHIMIOKINE MARQUEE ET TROUSSE D'ANALYSE

DESCRIPTION

Domaine technique de l'invention

La présente invention se rapporte à un procédé de synthèse d'une chimiokine, modifiée ou non modifiée, marquée au niveau d'au moins un acide aminé déterminé et à au moins une position déterminée de sa séquence, à une chimiokine obtenue par ledit procédé, et à une trousse d'analyse des récepteurs et des molécules qui interagissent avec les chimiokines.

Les chimiokines sont des facteurs solubles ou cytokines chimiotactiques indispensables au recrutement des cellules circulantes sur les sites inflammatoires et sont impliqués dans certains aspects de l'hématopoïèse chez l'homme et les animaux. Elles possèdent également de nombreuses autres activités au niveau de la prolifération, de la différenciation et de l'activation fonctionnelle de leur cible cellulaire.

Le tableau (I) suivant montre des exemples de conditions inflammatoires chez l'homme où des chimiokines ont été détectées dans certains tissus ou fluides corporels par immunohistochimie ou par test ELISA.

Tableau (I) : Chimiokines détectées et maladies

Chimiokine	Site	Maladies
IL-8, ENA-78-MCP-1	Fluide de lavage	Muscoviscidose
IL-8, ENA-78, MCP-1, RANTES	Tissus	Maladies pulmonaires aiguës
MCP-1, MIP-1 α , RANTES	Fluide de lavage	Réactions asthmatiques
IL-8, MIP-1 α , MCP-1, RANTES	Plasma	Endotoxémie

(Suite Tableau I)

Chimiokine	Site	Maladies
IL-8, ENA-78, MCP-1, MIP-1 α	Liquide synovial	Polyarthrite rhumatoïde
MIP-1 β	Liquide synovial	Ostéoarthrite
IL-8, GRO α , β , γ , MCP-1, IP-10, ENA-78	Liquide synovial	Squame psoriasique
IL-8, MCP-1, MIP 1 α / β , RANTES, IP-10	Extrait de tissus	Inflammation gastro-intestinales
MCP-1, MIP 1 α / β , RANTES, IL-8, GRO β	Tissus	Artériosclérose
IL-8, MCP-1	Tissus	Glomérulonéphrite à complexe antigène-anticorps
IP-8, IP-10, MCP-1, RANTES, MIP-1 α / β	Tissus	Uvéo-rétinite
IL-10	Tissus	Lèpre tuberculeuse
IL-8	Plasma	Maladies opportunes post-opératoires
MCP-10	Tissus	Site de cicatrisation de blessure
MCP-1	Liquide céphalo-rachidien	Encéphalo-myéélite à cytomégalovirus
RANTES, Eotaxine, IL-8, MCP-1, IP-10	Tissus	Eczéma constitutionnel et de contact

Il s'agit de polypeptides de faible masse moléculaire, de 8 à 10 kDa, ayant une forte affinité pour l'héparine. Les formes matures sont comprises entre 68 et 94 acides aminés et présentent une homologie de séquence allant de 20 à 80%.

Parmi elles, RANTES ("Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted") est un polypeptide de 68 acides aminés dont l'expression et la

sécrétion sont régulées par l'activation des lymphocytes T normaux.

La séquence RANTES est la suivante : Ser-Pro-Tyr-Ser-Ser-Asp-Thr-Thr-Pro-Cys-Cys-Phe-Ala-Tyr-Ile-Ala-Arg-Pro-Leu-Pro-Arg-Ala-His-Ile-Lys-Glu-Tyr-Phe-Tyr-Thr-Ser-Gly-Lys-Cys-Ser-Asn-Pro-Ala-Val-Val-Phe-Val-Thr-Arg-Lys-Asn-Arg-Gln-Val-Cys-Ala-Asn-Pro-Glu-Lys-Lys-Trp-Val-Arg-Glu-Tyr-Ile-Asn-Ser-Leu-Glu-Met-Ser.

Les récepteurs de ces chimiokines, et notamment de RANTES, font partie de la sous-famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G ("Seven Transmembrane G-Protein-Coupled Receptor").

Les chimiokines interagissent aussi avec des protéoglycanes qui peuvent les immobiliser à la surface des cellules, participant ainsi au gradient chimiotactique requis pour l'adhésion et la migration cellule/cellule.

Plus récemment, des récepteurs de chimiokine tels que CCR-5, un récepteur pour RANTES, ont été identifiés comme cofacteurs majeurs pour l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans les cellules cibles, et notamment RANTES a été montré comme bloquant l'entrée du VIH. Toutefois, RANTES doit s'associer avec des glycosaminoglycanes pour être actif contre le VIH.

Une telle association est également observée dans les granules sécrétoires des lymphocytes T cytotoxiques et peut avoir une signification fonctionnelle.

La compréhension des interactions des chimiokines avec leur cellules cibles est donc très importante notamment pour le développement d'agent thérapeutiques tant pour les désordres inflammatoires que pour l'infection par le VIH.

Les recherches dans ce domaine nécessitent en conséquence l'utilisation de dérivés de chimiokines marquées spécifiquement et facilement détectables. Ces

chimiokines marquées doivent permettre d'étudier les interactions des chimiokines avec leurs récepteurs et d'autres ligands, et de déterminer leur mécanismes d'action tant dans les désordres inflammatoires que pathogènes dus par exemple au VIH.

Art antérieur

Actuellement, des chimiokines marquées spécifiquement, en une position déterminée de leur séquence d'acides aminés, font défaut. Des dérivés biotinylés de chimiokines recombinantes (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8) sont disponibles par la société R&D Systems, mais ces dérivés sont obtenus par modification chimique d'une protéine recombinante, et de ce fait, ne sont pas obtenus de manière homogène, ne sont pas marqués spécifiquement et peuvent présenter des propriétés fonctionnelles altérées d'une façon non contrôlable et non reproductible.

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de fournir un procédé de synthèse d'une chimiokine, qui permet d'obtenir une chimiokine, modifiée ou non, marquée au niveau d'un acide aminé déterminé et à une position déterminée de la séquence de la chimiokine.

Par chimiokine modifiée ou non modifiée, on entend une chimiokine dont la séquence d'acides aminés est modifiée ou non modifiée, au niveau de un ou de plusieurs acides aminés, et par chimiokine marquée, on entend séquence peptidique de la chimiokine sur laquelle est (sont) fixée(s) une ou plusieurs molécules de marquage.

Le procédé de l'invention peut se caractériser en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

a) une synthèse chimique peptidique, de préférence sur un support solide, de la séquence d'acides aminés de la chimiokine, ou d'une séquence modifiée de celle-ci, à partir des acides aminés requis, dans laquelle les fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés requis et la fonction réactive α -aminique de l'acide aminé N-terminal de la séquence synthétisée sont protégées par des groupements protecteurs appropriés, et dans laquelle au moins un groupement protecteur d'un acide aminé déterminé, à au moins une position déterminée de ladite séquence, est orthogonal et choisi de telle sorte qu'il puisse être retiré de la fonction réactive dudit acide aminé déterminé à ladite position déterminée, indépendamment du ou des autres groupements protecteurs des fonctions réactives des autres acides aminés de la séquence,

b) un retrait dudit groupement protecteur orthogonal dudit acide aminé déterminé à la position déterminée de la séquence d'acides aminés de la chimiokine obtenue à l'étape a), de manière à libérer ladite fonction réactive dudit acide aminé déterminé,

c) un couplage dudit acide aminé déterminé, par ladite fonction réactive libérée dans l'étape b), soit directement, soit indirectement, avec une molécule de marquage ou un précurseur de celle-ci de manière à obtenir une séquence d'acides aminés de la chimiokine marquée au niveau dudit acide aminé déterminé,

d) un retrait des autres groupements protecteurs, différents dudit groupement protecteur orthogonal, de la séquence de la chimiokine

5

6

10

5

15

marquée obtenue à l'étape c) de manière à obtenir une séquence d'acides aminés marquée de la chimiokine, ou une séquence d'acides aminés modifiée marquée de celle-ci, au niveau d'un acide aminé déterminé à une position déterminée, et

e) une récupération de ladite séquence marquée obtenue à l'étape d).

20

10 Selon l'invention, le procédé de l'invention peut aussi se caractériser en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25

15

30

20

35

25

α) une synthèse chimique peptidique, de préférence sur un support solide, de la séquence d'acides aminés de la chimiokine, ou d'une séquence modifiée de celle-ci, à partir des acides aminés requis, dans laquelle les chaînes latérales des acides aminés requis sont protégées par des groupements protecteurs appropriés ; et dans laquelle au moins un acide aminé, à au moins une position déterminée dans ladite séquence est couplé à une molécule de marquage, de manière à obtenir une séquence de la chimiokine marquée au niveau dudit acide aminé déterminé,

40

β) une récupération de ladite séquence marquée obtenue à l'étape α).

45

30

50

35

Selon l'invention, la synthèse chimique peptidique de la séquence d'acides aminés de la chimiokine, ou d'une séquence modifiée de celle-ci peut être une quelconque synthèse chimique adéquate pour synthétiser une telle séquence d'acides aminés. De préférence, cette synthèse est réalisée sur un support solide, qui peut être un quelconque support solide adéquat pour une

55

5 telle synthèse, par exemple une résine telle que celle
10 citée dans les exemples ci-après. Cette synthèse peut
être réalisée par exemple dans un synthétiseur
automatique de peptide, par exemple de type Applied
5 Biosystems Model 433, Foster City, Californie, USA. Le
support peut être par exemple une résine p-
15 hydroxyméthyl phénoxyméthyl polystyrène ou une résine
équivalente.

Selon l'invention, les groupements protecteurs
10 appropriés peuvent être des molécules qui permettent de
protéger les fonctions réactives des chaînes latérales
de certains acides aminés et la fonction réactive α -
aminique de l'extrémité N-terminale de la séquence qui
ne seront pas couplés à la molécule de marquage, c'est-
25 à-dire de bloquer ces fonctions réactives pour qu'elles
ne réagissent pas avec les réactifs utilisés dans une
étape ultérieure du procédé de l'invention.

Selon l'invention, ces groupements protecteurs
30 appropriés peuvent être des molécules qui forment avec
les fonctions réactives à protéger une liaison chimique
stable dans les conditions de synthèse de la séquence
peptidique de l'invention, et clivable à la fin de
35 ladite synthèse.

Par fonction réactive, on entend ci-après les
25 fonctions réactives des chaînes latérales des acides
aminés qui n'interviennent pas dans les liaisons
peptidiques et la fonction réactive α -aminique de
l'acide aminé N-terminal de la séquence synthétisée.
Les fonctions réactives des chaînes latérales des
30 acides aminés peuvent être par exemple des fonctions
-NH₂, -COOH, -SH, -OH des chaînes latérales d'acides
aminés tels que par exemple la lysine, les acides
45 aspartique et glutamique, la cystéine, la sérine et la
thréonine respectivement.

Selon l'invention, la synthèse chimique en phase solide peut être par exemple réalisée en utilisant le groupement protecteur 9-fluorénylméthoxycarbonyl(Fmoc), pour la fonction α -aminique des acides aminés dans la séquence (c'est-à-dire différents de l'acide aminé N-terminal), et par exemple des groupements protecteurs des fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés formant avec ces fonctions des liaisons stables en matériau basique, mais clivables en milieu acide.

Selon l'invention, la synthèse chimique en phase solide peut alors être réalisée en utilisant par exemple le groupement protecteur tertio-butyloxycarbonyl (tBoc) pour la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal, ou tout autre groupement protecteur stable dans une étape ultérieure du procédé de l'invention pour cette fonction α -aminique, lorsqu'on désire marquer la chaîne latérale d'un acide aminé de la séquence. Le groupement protecteur tBoc présente la caractéristique de former avec les fonctions réactives à protéger une liaison stable en milieu acide. Aussi, selon l'invention, un groupement protecteur présentant la même caractéristique que tBoc peut également être utilisé.

Selon l'invention, la synthèse chimique précitée peut aussi être réalisée par exemple en utilisant le Fmoc pour la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal, lorsqu'on désire marquer la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal de la séquence de la chimiokine.

Selon l'invention, le groupement protecteur orthogonal est une molécule différente des autres groupements protecteurs utilisés dans le procédé de l'invention, qui peut être liée aux fonctions réactives précitées et être retirée spécifiquement de ces

fonctions au moyen d'un réactif approprié sans que les autres groupements protecteurs des autres fonctions réactives soient retirés. Ce groupement protecteur peut être un de ceux connus de l'homme du métier. Il peut être choisi en fonction de la synthèse chimique utilisée et de la fonction réactive à protéger : il s'agit, par exemple du Fmoc, du 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle (Dde), du 4-méthyltrityle (Mtt), ou de l'allyloxycarbonyl (Alloc) pour protéger la fonction réactive -NH₂ de la chaîne latérale d'un acide aminé tel que la lysine, ou de la fonction α-aminique de l'acide aminé N-terminal de la séquence, par exemple de l'allyle ou du 4[N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-méthylbutyl]-amino]benzyle (Dmab) pour protéger la fonction -COOH de la chaîne latérale de l'acide aspartique ou glutamique, par exemple le trityle pour protéger la fonction -OH de la chaîne latérale de la sérine ou de la thréonine, par exemple le S-tertio-butylthio (tButhio) pour protéger la fonction -SH de la chaîne latérale de la cystéine, par exemple dans la chimie qui utilise le Fmoc pour la protection temporaire de la fonction α-aminique des acides aminés.

Ces groupements protecteurs orthogonaux peuvent être retirés des fonctions réactives des acides aminés au moyen d'un réactif approprié : par exemple au moyen d'hydrazine par exemple à 2% par exemple dans un solvant N-méthyl pyrrolidone pour retirer le Dde de la chaîne latérale de l'acide aminé lysine ou le Dmab de la chaîne latérale des acides aminés acides aspartique et glutamique, par exemple au moyen d'un catalyseur palladium pour l'allyle de la chaîne latérale des acides aminés acides aspartique et glutamique ou pour l'Alloc de la chaîne latérale de l'acide aminé lysine, par exemple au moyen de l'acide trifluoroacétique à 1%

10.

pour le trityle de la chaîne latérale des acides aminés sérine et thréonine et pour le Mtt de la chaîne latérale de l'acide aminé lysine, par exemple au moyen des thiols ou de la tributylphosphine pour le tButhio de la chaîne latérale de l'acide aminé cystéine, par exemple au moyen de pipéridine par exemple à 20% par exemple dans un solvant N-méthylpyrrolidone pour retirer le Fmoc de la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal.

Selon l'invention, la synthèse chimique peptidique en phase solide peut être réalisée en présence d'hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tétraméthyluronium, ou d'un mélange de la N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et de N-hydroxyazabenzotriazole.

En protégeant d'une manière spécifique la fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé déterminé, à une position déterminée dans la séquence, et/ou la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal, au moyen d'un groupement protecteur orthogonal, il est possible, selon le procédé de l'invention, de retirer spécifiquement ce groupement protecteur orthogonal pour libérer la fonction réactive de la chaîne latérale dudit acide aminé, et/ou de ladite fonction α -aminique de l'acide aminé de l'extrémité N-terminale de la séquence, sans libérer les autres fonctions réactives des autres acides aminés protégées par le ou les autres groupements protecteurs.

La fonction réactive dudit acide aminé déterminée peut alors être couplée, par une réaction chimique spécifique, à une molécule de marquage ou à un précurseur de celle-ci, de manière à obtenir une séquence d'acide aminé marquée au niveau dudit acide aminé déterminé. Le couplage est de préférence réalisé au moyen d'une liaison covalente entre la fonction

réactive de l'acide aminé déterminé et la molécule de marquage.

La molécule de marquage peut être au choix l'une quelconque des molécules de marquage des protéines ou des peptides connues de l'homme du métier. Cette molécule peut être par exemple une molécule comprenant ou pouvant incorporer un élément radioactif pour une détection par une mesure de la radioactivité, ou une molécule adéquate pour une détection par les méthodes classiques immunoenzymatiques, immunocytochimiques ou par cytométrie de flux (FACS (marque déposée) (FACStar, Plus, Becton-Dickinson, Sans José, USA)), grâce à une fluorescence ou une coloration. La molécule de marquage peut aussi être un précurseur capable de libérer la fonction de marquage après une réaction chimique ou photochimique.

Selon l'invention, cette molécule de marquage peut être choisie dans un ensemble comprenant la biotine, un dérivé de la biotine, la fluorescéine, un dérivé de la fluorescéine ou un autre fluorochrome connu de l'homme du métier.

La molécule de marquage peut être par exemple une molécule qui peut être activée ou couplée à une molécule de détection pour pouvoir être détectée ou détectable. Lorsque la molécule de marquage est par exemple la biotine, ou un dérivé de la biotine, elle peut être reconnue à travers l'utilisation de son ligand spécifique, avidine ou streptavidine. La molécule de marquage peut aussi être une autre molécule que la biotine, qui peut être reconnue à travers l'avidine ou la streptavidine. L'avidine et la streptavidine peuvent être couplées à un marqueur fluorescent ou à un enzyme de façon à pouvoir détecter la biotine spécifiquement à travers la fluorescence ou une coloration. La chimiokine marquée à la biotine peut

être détectée par microscope à fluorescence en utilisant par exemple la streptavidine-Texas Red ou la streptavidine couplée à un autre fluorochrome ; par microscope optique ou par un colorimètre par examen de la coloration après addition de la streptavidine-peroxidase, puis le substrat adéquat de la peroxydase ; ou par cytométrie de flux, par analyse de la fluorescence après addition par exemple de streptavidine couplée à la phycoérythrine ou à tout autre fluorochrome.

Ainsi, selon le procédé de la présente invention, il est possible de préparer une chimiokine marquée par une molécule de marquage en une position déterminée, directement utilisable pour détecter des récepteurs et des ligands de cette chimiokine à la surface d'une cellule, de manière très précise, et de préparer une molécule marquée par un précurseur de marqueur en une position déterminée qui peut être activée ou couplée à une molécule de marquage avant d'être utilisée pour détecter des récepteurs et des ligands de cette chimiokine à la surface d'une cellule.

Le couplage de la fonction réactive dudit acide aminé avec la molécule de marquage ou avec un précurseur de celle-ci peut être directe ou indirecte. Le couplage de la molécule de marquage direct est un couplage réalisé directement entre la molécule de marquage et la fonction réactive de l'acide aminé déterminé. Ce couplage réalisé par l'une quelconque des réactions chimiques permettant de former une liaison covalente entre la fonction réactive de l'acide aminé et la molécule de marquage.

Ce couplage peut être réalisé, par exemple, à travers une liaison amide ou sulfonamide entre la fonction ϵ -aminique de la chaîne latérale d'un acide aminé lysine, ou entre la fonction α -aminique de

l'acide aminé en position N-terminale, de la chimiokine et la fonction carboxylique ou sulfonique, respectivement, de la molécule de marquage, ou entre la fonction carboxylique d'un acide aminé aspartique ou glutamique de la chimiokine et une fonction aminique de la molécule de marquage. Ce couplage peut être réalisé aussi à travers une liaison thioéther entre la fonction thiol d'un acide aminé cystéine de la chimiokine et une fonction maleimide ou iodoacétyl de la molécule de marquage.

Ce marquage peut être réalisé aussi en utilisant, pendant la synthèse de la séquence de la chimiokine, un acide aminé qui est déjà lié à un marqueur tel que ceux précités, par exemple l'acide aminé biotinyl-L-lysine (biocytine) ou un autre dérivé de la biotine. C'est le cas notamment du procédé de l'invention comprenant les étapes α et β précédemment citées.

Le couplage peut également être indirect. En effet, il est possible que la molécule de marquage greffée directement sur la chaîne latérale d'un acide aminé présente une gêne stérique pour le repliement de la chimiokine et/ou présente une gêne stérique pour la liaison de la chimiokine marquée avec un récepteur ou un ligand. C'est pourquoi, il peut être nécessaire de "prolonger" la chaîne latérale de l'acide aminé au moyen d'un bras, qui peut être par exemple une molécule organique comportant à une première extrémité une fonction chimique de liaison avec la fonction réactive de l'acide aminé déterminé, et à une deuxième extrémité une fonction chimique de liaison avec la molécule de marquage ou un précurseur de celui-ci, par exemple l'acide 6-aminocaproïque.

Un "bras" peut également être greffé sur la fonction α -aminique de l'acide aminé de l'extrémité N-terminale de la séquence de la chimiokine.

Ce "bras" peut être greffé sur la fonction réactive de la chaîne latérale de l'acide aminé déterminé, ou sur la fonction α -aminique de l'acide aminé de l'extrémité N-terminale de la séquence de la chimiokine synthétisée, par l'une quelconque des réactions chimiques permettant de former une liaison covalente entre la fonction chimique de liaison du bras avec la fonction réactive de la chaîne latérale de l'acide aminé déterminé, et le marqueur peut être couplé au bras par l'une quelconque des réactions chimiques classiques permettant de former une liaison covalente entre la fonction chimique de liaison du bras avec le marqueur, ou un précurseur de celui-ci, et ce dernier.

Dans une variante selon l'invention, le "bras" peut être présent ou fixé sur la molécule de marquage. Ce "bras" peut être un de ceux précités.

Selon l'invention, dans certains cas, c'est une séquence modifiée de la chimiokine qui peut être fabriquée.

En effet, si on désire marquer un acide aminé déterminé, à une position déterminée dans la séquence de la chimiokine, qui ne possède pas de fonction réactive sur sa chaîne latérale, tel que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, on peut remplacer ledit acide aminé à ladite position déterminée par un autre acide aminé possédant une fonction chimique réactive sur sa chaîne latérale tel que la lysine, la cystéine, la sérine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, lors de la synthèse de la chimiokine.

Selon l'invention, l'acide aminé qui ne possède pas de fonction réactive sur sa chaîne latérale peut aussi être remplacé par toute molécule possédant au moins une fonction $-NH_2$, au moins une fonction $-COOH$ et

au moins une chaîne latérale possédant une fonction réactive utile pour le couplage à la molécule de marquage.

Ainsi, à cette position déterminée, l'acide aminé remplaçant l'acide aminé de la séquence non modifiée de la chimiokine, ou séquence d'origine, peut être marqué par une molécule de marquage ou un précurseur de celle-ci.

Il sera aisément compris par l'homme du métier que plusieurs acides aminés de la séquence de la chimiokine peuvent ainsi être remplacés si nécessaire pour marquer la chimiokine en plusieurs positions déterminées.

Dé préférence, selon le procédé de l'invention, la chimiokine marquée synthétisée doit pouvoir retrouver sa conformation tridimensionnelle d'origine pour pouvoir se fixer sur ses récepteurs ou adhérer à ses ligands. Aussi, lorsqu'on désire obtenir une chimiokine marquée qui a le même comportement pour ses récepteurs et ses ligands que la chimiokine non marquée, il est préférable que le marquage soit effectué au niveau d'un, ou de plusieurs, acide(s) aminé(s) de telle sorte que ce marquage ne gêne pas le repliement de la chimiokine dans sa conformation tridimensionnelle d'origine, autrement dit la position déterminée dans la séquence d'acides aminés de la chimiokine peut être une position de la séquence qui ne gêne pas l'activité biologique de la chimiokine.

Toutefois, il peut aussi être décidé de gêner volontairement le repliement de la chimiokine, pour fabriquer une chimiokine marquée n'ayant pas la même conformation tridimensionnelle que la chimiokine non marquée correspondante. Une telle chimiokine peut en effet être utile pour l'étude des interactions de la chimiokine avec ses récepteurs et/ou ses ligands.

De plus, le procédé de la présente invention permet de fabriquer une chimiokine modifiée, marquée, de manière à modifier sa conformation tridimensionnelle et/ou à modifier son ou ses interaction(s) avec ses récepteurs et/ou ses ligands. Dans ce cas, lors de la synthèse de la chimiokine, certains acides aminés requis pour la synthèse de la chimiokine sont remplacés par d'autres acides aminés. Ces acides aminés seront choisis en fonction de leur rôle dans la conformation du peptide. La chimiokine modifiée marquée obtenue peut être utile pour l'étude de ses interactions avec ses récepteurs et/ou ses ligands.

Par séquence modifiée de la chimiokine, il peut donc être compris :

- soit une séquence modifiée spécialement pour fixer une molécule de marquage, ou un précurseur de celle-ci, à une position déterminée de la séquence de la chimiokine, là où l'acide aminé d'origine ne possède pas de fonction réactive sur sa chaîne latérale, cette modification étant destinée à remplacer l'acide aminé d'origine par un acide aminé possédant une telle fonction,
- soit une séquence modifiée spécialement pour modifier la conformation tridimensionnelle de la chimiokine et/ou à modifier son ou ses interactions avec ses récepteurs et/ou ses ligands,
- soit une combinaison de ses modifications.

Le tableau (II) suivant regroupe des exemples de chimiokines qui peuvent être synthétisées marquées, et éventuellement modifiées, selon le procédé de la présente invention, ainsi que leurs récepteurs cellulaires respectifs connus.

Tableau (II)

Chimiokines	Récepteurs
IL-8	CXCR-1 CXCR-2 DARC
GRO - α , - β , - γ	CXCR-2
ENA-78	CXCR-2
NAP-2	CXCR-2
IP-10	CXCR-3
MIG	CXCR-3
SDF -1	CXCR-4
MIP -1 α	CCR-1 CCR-4 CCR-5
MIP -1 β	CCR-5
MCP-1	CCR-2A CCR-2B CCR-4 DARC
RANTES	CCR-1 CCR-3 CCR-4 CCR-5 DARC
MCP-3	CCR-1 CCR-2A CCR-2B CCR-3
Eotaxine	CCR-3
Lymphotactine	?
GRO- α	DARC

5

Comme nous l'avons vu précédemment, RANTES est un peptide comprenant 68 acides aminés.

Le procédé selon l'invention permet par exemple de fabriquer RANTES marquée en une position déterminée telle que par exemple la position 66 ou 67 à l'extrémité C-terminale de ce peptide, ou encore la position 1, 25, 33 ou 45, par exemple avec une biotine.

La séquence d'acides aminés de RANTES est décrite précédemment, et il n'est pas nécessaire ici de la réécrire. Simplement, il est à noter qu'à la position 67 de RANTES se trouve une méthionine. Cet acide aminé ne présentant pas de fonction réactive sur sa chaîne latérale, selon le procédé de la présente invention, il peut être remplacé par exemple par une lysine qui présente une fonction réactive $-NH_2$ sur sa chaîne latérale, ou par une cystéine qui présente une fonction réactive $-SH$ sur sa chaîne latérale.

Selon l'invention, l'étape de récupération du procédé peut être une étape de récupération classique d'un peptide, elle peut comprendre une étape de un traitement classique de la séquence polypeptidique obtenue qui permet la formation d'éventuels ponts disulfures dans la séquence peptidique synthétisée et la purification de la chimiokine marquée.

Cette étape de récupération peut par exemple comprendre deux étapes de purification par chromatographie en phase liquide haute pression en phase inversée.

Le procédé de la présente invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés de l'art antérieur. En effet, il permet de fabriquer effectivement, de manière reproductible, une chimiokine modifiée ou non, marquée de manière homogène sur un, ou plusieurs, acide(s) aminé(s) déterminé(s) à une, ou plusieurs, positions déterminées de la séquence de la chimiokine.

De plus, du fait d'un marquage spécifique en une position déterminée de la séquence, le rendement de synthèse du procédé de la présente invention est excellent par rapport aux procédés de l'art antérieur qui utilisent des protéines recombinantes marquées de manière aléatoire. En effet, les procédés de l'art

antérieur ne permettent pas d'obtenir une chimiokine, modifiée ou non, marquée en une, ou plusieurs, position(s) déterminée(s) conformément à la présente invention, et nécessitent de nombreuses étapes de purification sans obtenir le résultat de la présente invention.

De plus, le procédé de l'invention est économique par rapport aux procédés de recombinaison génétique de l'art antérieur, car il fait intervenir des réactions chimiques qui sont facilement contrôlables et nécessitent moins d'étapes et de précautions opératoires.

Le procédé de la présente invention est donc en particulier très intéressant pour une production en masse d'une chimiokine marquée, mais aussi pour une fabrication en laboratoire.

Selon l'invention, lorsque la chimiokine est RANTES, elle peut être également marquée à une autre position de la séquence qui ne gêne pas les propriétés biologiques de la chimiokine, par exemple avec une biotine.

Selon l'invention, lorsque la chimiokine est RANTES, elle peut être également marquée à une autre position de la séquence qui ne gêne pas les propriétés biologiques de la chimiokine, par exemple avec une biotine.

La présente invention se rapporte également à une chimiokine marquée caractérisée en ce que ladite chimiokine est une chimiokine modifiée ou non modifiée, dont la séquence d'acide aminé est marquée au niveau d'un acide aminé déterminé à une position déterminée de ladite séquence, ladite chimiokine étant susceptible d'être obtenue par le procédé de la présente invention.

5

20

10

Selon l'invention, la chimiokine peut être une de celles citées dans le tableau (II) précédent, par exemple RANTES, IL-8, etc...

15

Selon l'invention, la molécule de marquage peut être une de celles précitées, ou toute autre molécule de marquage qui peut être couplée à une chimiokine par le procédé de la présente invention.

20

Selon l'invention, lorsque la chimiokine est RANTES, elle peut être modifiée de manière à comporter en position 67, à côté de l'extrémité C-terminale, par exemple une lysine ou une cystéine ou d'autres acides aminés adaptés pour un couplage à la molécule de marquage, à la place de la méthionine. Dans ce cas, elle peut être marquée par couplage avec une biotine.

25

Selon l'invention, lorsque la chimiokine est RANTES, elle peut être également marquée par exemple en position 66, à côté de l'extrémité C-terminale, en position 45, 33 ou 25, ou sur la fonction α -aminique de l'acide aminé de l'extrémité N-terminale de la séquence de RANTES, c'est-à-dire en position 1 de la séquence, par exemple avec une biotine.

30

20

35

La présente invention se rapporte également à une composition comprenant une chimiokine marquée, caractérisée en ce que ladite composition comprend, de manière homogène et au choix, une ou plusieurs chimiokines marquées de la présente invention.

40

Selon l'invention, ladite composition peut comprendre de manière homogène une chimiokine marquée en une seule position déterminée de sa séquence d'acide aminé. Par exemple, lorsque la chimiokine est RANTES, la composition selon l'invention peut comprendre de manière homogène RANTES marqué au choix en une ou plusieurs position(s) déterminée(s) de sa séquence, par exemple à la position 67 de sa séquence d'acides

45

50

35

55

aminés, du côté de l'extrémité C-terminale. Comme décrit précédemment, cette chimiokine peut être également marquée à une autre position de la séquence, par exemple qui ne gêne pas les propriétés biologiques de la chimiokine, par exemple avec une biotine.

Comme nous l'avons vu précédemment, une chimiokine marquée en une position déterminée, selon l'invention, c'est-à-dire de manière homogène et reproductible, est extrêmement utile dans les études des récepteurs et ligands des chimiokines, par exemple pour la compréhension des mécanismes intimes de reconnaissance et de liaison du VIH avec ses cellules cibles. Ces études sont nécessaires notamment pour le développement de nouvelles thérapies et de nouveaux médicaments pour lutter contre de nombreuses maladies, par exemple contre le SIDA ou d'autres pathologies telles que celles citées dans le tableau I précédent.

Aussi, la présente invention se rapporte également à une trousse d'analyse d'un récepteur et/ou d'une molécule d'adhésion d'une chimiokine, caractérisé en ce qu'il comprend une composition selon l'invention.

Selon l'invention, cette trousse peut comprendre en outre un réactif adéquat permettant de détecter la ou les chimiokine(s) marquée(s) de la composition. Selon l'invention, la chimiokine peut être par exemple une de celles citées dans le tableau (II) précédent, par exemple RANTES ou IL-8.

Lorsque la chimiokine est RANTES, elle peut être marquée par exemple en position 66, ou 67 par exemple avec une biotine.

Selon l'invention, le réactif révélant la présence du marqueur sera fonction de la molécule de marquage utilisée, ou du précurseur de celle-ci. Par exemple, ce réactif peut être l'avidine ou la streptavidine lorsque

la molécule de marquage de la chimiokine est la biotine.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des figures en annexe et des exemples qui suivent donnés, bien entendu, à titre illustratif et non limitatif.

Brève description des figures

- les figures 1A et 1B sont des tracés réalisés à partir de résultats d'analyse de masse par électropulvérisation de RANTES biotinylé selon l'invention ;
- la figure 2 montre une série de courbes illustrant la fixation de différentes formes de RANTES biotinylé selon l'invention à différentes positions déterminées de sa séquence (RANTES-b1, -b25, -b33, -b45 et -b67) et à différentes concentrations (10 nM, 50 nM, 100 nM) à des macrophages dérivés de monocytes (MDM) de type 5d ;
- les figures 3A et 3B représentent deux courbes illustrant l'effet d'un traitement enzymatique spécifique des protéoglycanes sur la fixation de RANTES-b67 aux MDM-5d et MDM-MCSF ("Macrophage Colony-Stimulating Factor") respectivement ;
- les figures 4(I), 4(II), 4(III) et 4(IV) représentent quatre courbes illustrant la fixation de RANTES-b67 sur des cellules Hela/CD4 (figures 4(I) et 4(II)) et sur des cellules Hela/CD4/CCR-5 (figures 4(III) et 4(IV)).

**Exemple 1 : Synthèse d'une chimiokine marquée selon 1
procédé de la présente invention**

Cet exemple décrit la préparation d'un dérivé biotinylé de RANTES marqué spécifiquement, par synthèse en phase solide selon le procédé de la présente invention.

Dans cet exemple, la position 67 à côté de l'extrémité C-terminale de RANTES a été choisie pour le marquage comme étant la position déterminée. Cette position de marquage permet une bonne exposition aux solvants et est assez éloignée de l'extrémité N-terminale, qui est présumée être la région de liaison avec le récepteur de RANTES, pour ne pas gêner l'interaction de RANTES marqué avec son récepteur.

La molécule de marquage choisie est la biotine.

Comme nous l'avons vu précédemment, RANTES possède en position 67, à côté de l'extrémité C-terminale, une méthionine, (Met67) qui n'a pas de fonction réactive sur sa chaîne latérale. De ce fait, lors de la synthèse de RANTES, cette méthionine est remplacée par une lysine qui présente une fonction amine sur sa chaîne latérale.

Le groupement protecteur de la fonction α -aminique pour les acides aminés requis pour synthétiser RANTES est le 9-fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc), sauf pour l'acide aminé de l'extrémité N-terminale qui comporte le groupement tertio-butyloxycarbonyl (tBoc). Les groupements protecteurs des fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés requis pour synthétiser RANTES sont les suivants : tertio-butyl éther pour la fonction -OH des acides aminés sérine, thréonine ; tyrosine ; tertio-butyl ester pour la fonction -COOH des acides aminés acides aspartique et glutamique ; 2,2,5,7,8-pentaméthylchromane-6-sulphonyl pour la fonction guanidinium de l'acide aminé

arginine ; trityl pour la fonction amide des acides aminés asparagine et glutamine, pour la fonction -SH des acides aminés cystéine et l'azote imidazolique de l'acide aminé histidine ; tertio-butyloxycarbonyl pour la fonction -NH₂ de acides aminés lysine.

Le groupement protecteur orthogonal pour la lysine déterminée, à la position 67 à côté de l'extrémité C-terminale (lys67) de RANTES choisi dans cet exemple est 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène) éthyle (Dde).

La synthèse de RANTES modifiée à partir des acides aminés requis ayant leur fonction réactive protégée est réalisée dans un synthétiseur automatique de type Applied Biosystems Model 433, Foster City, California, USA, en utilisant 100 mg de l'ester Fmoc-Serine(tertiobutyl) de la résine p-hydroxyméthylphénoxyméthyl polystyrène, avec une charge de 0,5 mmol/g, 200-400 mesh de la Société Novabiochem, France.

L'assemblage de la chaîne polypeptidique de RANTES a été réalisé en utilisant 1 mmole de chaque acide aminé sous forme protégé et à travers un couplage à la résine pendant 30 minutes de chaque acide aminé, sous forme d'un ester actif de N-hydroxyazabenzotriazole (HOAt). L'ester actif de chaque acide aminé a été formé en utilisant 1 mmole de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et 1 mmole de N-hydroxyazabenzotriazole dans le solvant N-méthylpyrrolidone. Le solvant utilisé dans la synthèse est du N-méthylpyrrolidone. Après chaque cycle d'assemblage d'un acide aminé, le groupement protecteur Fmoc de la fonction α-aminique est retiré par deux traitements de 5 minutes avec une solution de pipéridine 20% dans le solvant N-méthylpyrrolidone.

Lorsque la synthèse est terminée, on obtient une séquence peptidique modifiée en position 67 de RANTES,

dans laquelle la fonction α -aminique de l'acide aminé de l'extrémité N-terminale est protégée par un groupement tertio-butyloxycarbonyl (tBoc), les fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés requis sont protégées par des groupements protecteurs appropriés et dans laquelle la lysine 67 est protégée par un groupement protecteur orthogonal, différent des autres groupements protecteurs, de telle sorte qu'il puisse être retiré de la fonction $-NH_2$ de la chaîne latérale de la lysine 67 indépendamment des autres groupements protecteurs des fonctions réactives des autres acides aminés, cette séquence peptidique modifiée de RANTES étant fixée sur la résine.

Le groupement protecteur de la chaîne latérale de la lysine 67 est alors retiré spécifiquement en traitant le peptide lié à la résine trois fois 2 minutes avec une solution de méthylpyrrolidone à 2% d'hydrazine et un "bras" ("spacer") 6-aminocaproyl est alors incorporé, en couplant l'acide Fmoc-6-aminocaproïque par un traitement de deux fois une heure en milieu hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HBTU) avec un excès 20 fois molaire du "bras" 6-aminocaproyl. Le groupe Fmoc a ensuite été clivé par deux traitements de 5 minutes avec une solution comprenant 20% de pipéridine dans du N-méthylpyrrolidone et la biotine a été finalement couplée au peptide lié à la résine, avec un excès 20 fois molaire de biotine, pendant une nuit, en milieu HBTU.

Après le marquage avec la biotine, le peptide a été détaché de la résine et libéré de tous ces groupements protecteurs par un traitement acide de 90 minutes en utilisant un mélange contenant 82,5% d'acide trifluoroacétique, 5% de phénol, 5% d'eau, 5% de thioanisole et 2,5% d'éthane dithiol. Le peptide

complètement "déprotégé" a été précipité de la solution acide par addition avec de l'isopropyléther, le précipitat a été lavé deux fois avec l'éther, puis dissous dans une solution d'acide acétique 30% dans l'eau et enfin récupéré sous forme de poudre blanche après lyophilisation.

RANTES obtenu, biotinylé en position 67 du côté C-terminal de sa séquence peptidique (noté ci-après RANTES b-67), a été purifié par chromatographie en phase liquide haute pression en phase inversée ("reverse-phase HPLC"), d'abord sous forme réduite, puis après formation des ponts disulfure de RANTES.

La pureté de RANTES biotinylé a été vérifiée par une analyse HPLC et une électrophorèse capillaire.

L'identité du produit a été vérifiée par une analyse d'acides aminés et une spectrométrie de masse par électropulvérisation. Les figures 1A et 1B illustrent les résultats de cette analyse :

- figure 1A : résultats de l'analyse de masse par électropulvérisation de RANTES biotinylé, selon l'invention. Les masses 1020,5 ; 1166,0 ; 1360,2 ; et 1631,9 Da (Dalton) correspondent aux molécules de RANTES biotinylées présentant, respectivement 8, 7, 6 et 5 charges positives comme conséquence de l'addition de 8, 7, 6 et 5 protons dans la chambre d'ionisation,
- figure 1B : masse moyenne calculée sur les espèces multichargées observées dans le spectre A. La masse déterminée est de 8155.0 Da. La masse théorique est de 8155.1 Da.

Exemple 2 : Utilisation du composé selon l'invention

Afin de tester la fixation de RANTES biotinylé synthétisé dans l'exemple 1 sur des cellules en culture

primaire, nous avons utilisé des macrophages dérivés de monocytes (MDM), qui ont été obtenus suivant un premier protocole qui correspond à une adhérence de 5 jours de cellules mononucléaires du sang (PBMC) de donneurs sains (MDM-5d). Les cellules non-adhérentes ont été retirées et les MDM ont été cultivés pendant deux jours.

Une préparation différente de macrophages (MDM-MCSF) a été obtenue selon le second procédé suivant : adhérence d'une heure et culture pendant 7 jours en présence du facteur de croissance "macrophage colony-stimulating Factor" M-CSF recombinant exogène.

Les MDM-5d et les MDM-MCSF ont été caractérisés par un marquage immunofluorescent avec des anticorps monoclonaux FITC-IOT3 pour CD3, FITC-IOB4a pour CD19 et FITC-IOT4a pour CD4, ou un anticorps monoclonal témoin négatif FITC-IgG1 (Société Immunotech, Marseille, France).

Ces deux préparations contiennent des macrophages ayant différents états d'activation. En fait, le métabolisme des protéoglycanes est hautement régulé dans les macrophages et dépend de l'état d'activation de ces derniers.

5×10^5 MDM par cupule, préparés sous ces deux conditions ont été incubés en présence d'un anticorps anti-CCR-5 marqué à la fluorescéine (Société R&D). L'expression de CCR-5 est similaire dans les deux conditions.

Nous avons ensuite examiné la fixation de RANTES biotinylé sur ces cellules. 5×10^5 MDM par cupule, préparés sous les deux conditions ont été incubés avec différentes concentrations de RANTES biotinylé fabriqué dans l'exemple 1 dans 200 μ l de PBS-BSA à 4°C pendant 30 minutes.

Après cela, les cellules ont été lavées, imprégnées avec de la streptavidine-phycoerythrine (SPE) (1:800 ; de la société Becton-Dickinson) et examinées par analyse FACS (marque déposée) (FACStar, Plus, société Becton-Dickinson, San José, USA). RANTES biotinylé se lie avec MDM-5d d'une manière dose-dépendante, c'est-à-dire en fonction de la quantité de RANTES, de manière plus efficace qu'avec MDM-MCSF.

Par ailleurs, nous avons testé les propriétés chimiotactiques de RANTES b-67 et nous avons observé que cette molécule a une activité chimiotactique similaire à RANTES non marqué.

Afin de tester si RANTES biotinylé peut interagir avec les protéoglycanes à côté de CCR-5, nous avons traité les MDM pendant 1 heure à 37°C avec 4 mU d'héparitinase (EC.4.2.2.8) ou de chondroïtinase (EC.4.2.2.4) (de la société Sigma, Saint-Louis, MO) dans 200 µl de PBS, 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin (PBS-BSA), qui élimine les sulfates d'héparine et de chondroïtine des protéoglycanes respectivement. Les cellules ont été ensuite lavées et incubées avec RANTES biotinylé fabriqué dans l'exemple 1, puis imprégnées avec la SPE et analysées par FACS comme indiqué ci-dessus.

En traitant MDM-5d avec de la chondroïtinase, qui élimine de la surface des cellules le sulfate de chondroïtine, la liaison avec RANTES a été inhibée, mais aucun effet n'a été noté avec l'héparitinase. En fait, les macrophages n'expriment pas l'héparine sulfate. L'effet de la chondroïtinase sur l'affaiblissement de la liaison de RANTES avec MDM-MCSF était moins évident qu'avec MDM-5d.

Ces résultats montrent que RANTES biotinylé de l'invention interagit, en plus d'avec CCR-5, avec les protéoglycanes des macrophages. La présente invention a

5
10 donc permis de fournir une preuve de la variation de l'expression des protéoglycanes selon l'état d'activation des macrophages.

15 La figure 2 en annexe représente une série de
5 courbes illustrant la fixation de différentes formes de RANTES biotinylé selon la présente invention, à
10 différentes positions déterminées de sa séquence d'acides aminés (aa) : aa1, aa25, aa33, aa45 et aa67, notés RANTES-b1, -b25, -b33, -b45 et -b67
20 respectivement, et à différentes concentrations (10 nM, 50 nM, 100 nM) à des macrophages dérivés de monocytes MDM-5dd.

25 Les macrophages dérivés de monocytes (5×10^5 cellules) ont été obtenus par adhérence de 5 jours (MDM-5d) et ont été incubés avec des concentrations
30 variables (10 nM, 50 nM, 100 nM) de RANTES biotinylé à des positions variables de sa séquence d'acides aminés, notés RANTES-b1, -b25, -b33, -b45 et -b67, pendant 30 mn à 4°C. Après lavage, les cellules ont été
35 imprégnées avec de la streptavidine-phycoerythrine (SPE), puis examinées, après lavage et fixation à la PFA (paraformaldéhyde), par analyse par FACS. Les histogrammes pleins (témoins) représentent l'intensité de fluorescence des cellules non incubées avec RANTES
40 mais imprégnées avec la SPE. Les histogrammes vides correspondent à l'intensité de fluorescence obtenue lorsque les cellules ont été incubées avec RANTES biotinylé puis la SPE.

45 Ces résultats montrent que les différentes formes de RANTES biotinylé à des positions diverses n'ont pas la même capacité de fixation aux cellules. La meilleure fixation est obtenue avec RANTES biotinylé à la position 67 (RANTES b-67).

50 Les figures 3A et 3B en annexe représentent deux
55 courbes illustrant l'effet d'un traitement enzymatique

spécifique des protéoglycanes sur la fixation de RANTES-b67 aux MDM-5d et MDM-MCSF respectivement.

Les MDM-5d et les MDM-MCSF ont été obtenus comme précédemment. 5×10^5 cellules (MDM-5d ou MDM-MCSF) ont été traitées avec la chondroïtinase (histogrammes a) ou l'héparitinase (histogrammes b) ou non traitées (histogrammes c) comme décrit précédemment. Les cellules ont été ensuite incubées avec RANTES-b67 (50 nM), puis imprégnées avec la SPE, et analysées par FACS. Les histogrammes pleins correspondent aux cellules non incubées avec RANTES mais traitées à la SPE.

Ces résultats montrent d'une part que RANTES b-67 se fixe plus efficacement aux MDM-5d qu'aux MDM-MCSF. Comme l'expression de CCR-5, récepteur de RANTES, est similaire sur les deux types cellulaires, cette différence dans la fixation serait due à une différence dans l'expression des protéoglycanes, en particulier les sulfates de chondroïtine dont l'enlèvement par la chondroïtinase ramène la fixation de RANTES à un niveau similaire à celui des MDM-MCSF. Ces dernières cellules ne semblent pas exprimer ce type de protéoglycanes.

Exemple 3 : Analyse par cytométrie de flux (FACS) de lignées cellulaires Hela liant RANTES

Des lignées cellulaires exprimant CD4 (Hela/CD4), ou CD4 et CCR-5 (Hela/CD4/CCR-5) ont été obtenues de l'Institut Pasteur, France. Elles ont été cultivées dans du DMEM comprenant 500 µg/ml de l'antibiotique généticine G418, 10% de sérum de fœtus de veau, et 50 µg/ml de Penicilline-Streptomycine-Néomycine.

Les cellules ont été récupérées par adjonction de PBS froid à 1 mM EDTA, et prélèvement au moyen d'une spatule. Les cellules ont été mises en suspension à raison de 2×10^5 cellules dans 100 µl de PBS à 1 mg/ml

de BSA, et incubées pendant 30 minutes à 4°C avec différentes concentrations de RANTES biotinylé en position 67 (b-67) obtenu dans l'exemple 1. Après cela, les cellules ont été lavées, et mises en contact avec de la SPE (1:800 de la société Becton-Dickinson) et examinées par analyse par cytométrie de flux tel que dans l'exemple 2.

Comme indiqué, RANTES biotinylé B67 se lie d'une manière dose-dépendante à la fois aux cellules Hela (CD4 et aux cellules Hela/CD4/CCR-5). Toutefois, la liaison la plus efficace a été notée avec les cellules Hela/CCR-5).

Le fait que RANTES puisse aussi se lier à des cellules n'exprimant pas le récepteur CCR-5 de RANTES n'est pas surprenant car, comme décrit ci-dessus, RANTES est connu pour se lier aux protéoglycanes qui sont exprimées par les lignées cellulaires Hela, en particulier l'héparine sulfate.

Pour montrer que RANTES B67 interagit avec des protéoglycanes de surface cellulaire, 2×10^5 cellules Hela/CD4 ou Hela/CD4/CCR-5 en suspension dans 100 µl de PBS comprenant 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin (PBS-BSA), ont été traitées ou non pendant une heure à 37°C avec 2 mU d'héparitinase (EC.4.2.2.8) ou de la chondroïtine (EC.4.2.2.4) (Société Sigma, Saint-Louis) qui enlève les sulfates d'héparine et de chondroïtine respectivement de protéoglycanes.

Après une heure, les cellules ont été lavées et incubées pendant 30 minutes avec RANTES biotinylé B67 selon l'invention, dans 100 µl de PBS-BSA à 4°C. Après cela, les cellules ont été lavées, mises en contact avec de la SPE (1:800, de la Société Becton-Dickinson), et examinées par analyse FACS comme ci-dessus.

Le traitement des cellules avec l'héparitinase, qui enlève les sulfates d'héparine des surfaces des

cellules, inhibe la liaison de RANTES à la surface de ces cellules, mais aucun effet n'a été noté avec la chondroïtinase.

Il est important de noter que tandis que le traitement avec l'héparitinase supprime les liaisons de RANTES avec les cellules Hela/CD4, un tel traitement réduit drastiquement mais ne supprime pas complètement les liaisons de RANTES avec Hela/CD4/CCR-5. Ces résultats montrent que RANTES B67 interagit, en plus de CCR-5, avec les protéoglycanes, en particulier avec le sulfate d'héparine sur les cellules.

Les figures 4(I), 4(II), 4(III) et 4(IV) représentent quatre courbes illustrant la fixation de RANTES-b67 sur des cellules Hela/CD4 (figures 4(I) et 4(II)) et sur des cellules Hela/CD4/CCR-5 (figures 4(III) et 4(IV)).

Les cellules Hela/CD4 ou Hela/CD4/CCR-5 décrites précédemment ont été incubées ou non avec des concentrations variables de RANTES-b67 : 0 nM (courbes a), 10 nM (courbes b), 50 nM (courbes c) ou 100 nM (courbes d). Alternativement, les cellules ont été préalablement traitées avec de l'héparitinase (courbes e) comme décrit précédemment. La fixation de RANTES est déterminée par FACS comme dans le cas des exemples illustrés par les figures 2, 3A et 3B.

Sur les figures 4(I), (II), (III) et (IV) :

a-cellules + SPE (streptavidine-phycoerythrine)

b-cellules + RANTES-b67 (10 nM) + SPE

c-cellules + RANTES-b67 (50 nM) + SPE

d-cellules + RANTES-b67 (100 nM) + SPE

e-(cellules+héparitinase) + RANTES-b67 (50 nM) + SPE.

RANTES biotinylé, en relation avec la disponibilité commerciale des conjugués avidines/streptavidine peut être utilisé pour la

détection et l'étude des récepteurs et d'autres ligands des chimiokines, par exemple des protéoglycanes, à la surface des cellules ou dans des préparations de membranes. RANTES biotinylé en position 67 peut être préparé par synthèse en phase solide selon le procédé de la présente invention.

Différents procédés chimiques peuvent être utilisés pour assembler RANTES par une méthode de synthèse en phase solide avec des résultats similaires à ceux de la présente invention. La chimie de synthèse peptidique qui utilise par exemple le groupement protecteur tertibutyloxycarbonyl (tBoc) pour la fonction α -aminique des acides aminés et les groupements protecteurs pour les chaînes latérales réactives des acides aminés stables en milieu acide trifluoacétique et clivables en milieu acide fluorhydrique, connus par l'homme du métier, peuvent également être utilisés. Dans ce cas, d'autres groupements protecteurs orthogonaux connus par l'homme du métier doivent être utilisés.

De plus, des formes recombinantes de RANTES peuvent être spécifiquement biotinylées. Par exemple en incorporant une cystéine en position 67 ou 66, la fonction thiol réactive de la chaîne latérale peut être spécifiquement marquée en utilisant des réactifs de biotinylation disponible dans le commerce comme le 1-biotinamido-4-(4'-maleimidométhyl)cyclohexane-carboximido)butane, la N-iodoacétyl-N-biotinyl hexylène diamine, la N-(6(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide, etc....

Claims

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

34

REVENDEICATIONS

10

1. Procédé de synthèse d'une chimiokine marquée
comprenant les étapes suivantes :

5

15

10

20

25

15

30

20

2. Procédé de synthèse d'une chimiokine marquée,
comprenant les étapes suivantes :

35

25

40

30

45

50

35

55

telle sorte qu'il puisse être retiré de la fonction réactive de la chaîne latérale dudit acide aminé déterminé à ladite position déterminée, indépendamment du ou des autres groupements protecteurs des fonctions réactives des autres acides aminés de la séquence,

b) un retrait dudit groupement protecteur orthogonal dudit acide aminé déterminé à la position déterminée de la séquence de la chimiokine obtenue à l'étape a), de manière à libérer ladite fonction réactive dudit acide aminé déterminé,

c) un couplage dudit acide aminé déterminé, par ladite fonction réactive libérée dans l'étape b), soit directement, soit indirectement, avec une molécule de marquage de manière à obtenir une séquence de la chimiokine marquée au niveau dudit acide aminé déterminé,

d) un retrait des autres groupements protecteurs, différents dudit groupement protecteur orthogonal, de la séquence de la chimiokine marquée obtenue à l'étape c), de manière à obtenir une séquence d'acides aminés marquée de la chimiokine, ou une séquence d'acides aminés modifiée marquée de celle-ci, au niveau d'un acide aminé déterminé à une position déterminée, et

e) une récupération de ladite séquence marquée obtenue à l'étape d).

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la synthèse chimique étant faite en phase solide, elle est réalisée dans un synthétiseur automatique de peptides.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la synthèse chimique en phase solide est réalisée en utilisant le groupement protecteur 9-fluorenylméthoxycarbonyle pour la fonction α -aminique des acides aminés, et/ou le groupement protecteur tertio-butyloxycarbonyle pour la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les groupements protecteurs différents du groupement protecteur orthogonal sont des molécules qui forment avec les fonctions réactives à protéger une liaison stable en milieu basique, mais clivable en position basique.

6. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la synthèse chimique peptidique en phase solide est réalisée en présence d'hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl) 1,1,3,3-tétraméthyluronium, ou d'un mélange de la N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et de N-hydroxyazabenzotriazole.

7. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le, au moins un, groupement protecteur orthogonal est choisi en fonction de la synthèse chimique peptidique utilisée et de la fonction réactive à protéger dans un ensemble comprenant, le fluorénylméthoxycarbonyle, le 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle, le 4-méthyltrityle, l'allyloxycarbonyle, l'allyle, le 4[N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-méthylbutyl]-amino]benzyle, le trityle et le S-tertio-butylthio.

8. Procédé selon la revendication 2, dans lequel l'acide aminé déterminé ne possédant pas de fonction réactive sur sa chaîne latérale, il est remplacé lors

de la synthèse de l'étape a) par un acide aminé possédant une fonction réactive sur sa chaîne latérale.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 8 précédentes lorsqu'elles ne dépendent pas de la revendication 1, dans lequel le marquage étant indirect, la chaîne latérale de l'acide aminé déterminé, ou la fonction α -aminique de l'acide aminé N-terminal de la séquence de la chimiokine synthétisée, est prolongée au moyen d'un bras qui est une molécule organique comportant à une première extrémité une fonction de liaison avec la fonction réactive dudit acide aminé, et à une deuxième extrémité une fonction chimique de liaison avec la molécule de marquage.

10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel le bras est l'acide 6-aminocaproïque.

11. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le groupement protecteur orthogonal étant le 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène) éthyle, ou le 4[N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-méthylbutyl]-amino]benzyle, il est retiré de la fonction réactive de l'acide aminé déterminé à la position déterminée au moyen d'un traitement chimique à l'hydrazine.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel la molécule de marquage est choisie dans un ensemble comprenant la biotine, un dérivé de la biotine, et la fluorescéine ou un autre fluorochrome.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 et 3 à 12 précédentes lorsqu'elles ne

dépendent pas de la revendication 1, dans lequel le couplage avec la molécule de marquage est un couplage chimique destiné à former une liaison covalente entre la fonction réactive de l'acide aminé déterminé et la molécule de marquage.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans lequel la chimiokine synthétisée est choisie dans un ensemble comprenant IL-8, GRO α , β , γ , ENA-78, NAP-2, IP-10, MIG, SDF-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, MCP-3, Eotaxine, Lymphotactine et GRO.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la position déterminée dans la séquence d'acide aminé de la chimiokine est une position de la séquence qui ne gêne pas l'activité biologique de la chimiokine.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, dans lequel la chimiokine est RANTES.

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel la position déterminée dans la séquence d'acide aminé de RANTES est la position 66 ou 67 à côté de l'extrémité C-terminale, ou les positions 1, 25, 33 ou 45, de la séquence.

18. Procédé selon la revendication 16, dans lequel RANTES ayant une méthionine en position 67, cette méthionine est remplacée par une lysine ou une cystéine lors de l'étape de synthèse chimique peptidique de la chimiokine.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, dans lequel la molécule de marquage est la biotine ou d'autres molécules qui sont reconnues par l'avidine ou la streptavidine.

20. Procédé selon la revendication 1 dans laquelle l'acide aminé couplé à une molécule de marquage est choisi dans un ensemble comprenant la biocytine, ou un autre dérivé de la biotine.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape de récupération de ladite séquence marquée comprend une étape de purification de ladite séquence par deux étapes de chromatographie en phase liquide haute pression en phase inversée.

22. Chimiokine marquée caractérisée en ce que ladite chimiokine est une chimiokine modifiée ou non modifiée, dont la séquence d'acide aminé est marquée par une molécule de marquage au niveau d'un acide aminé déterminé à une position déterminée de ladite séquence, ladite chimiokine étant susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

23. Chimiokine selon la revendication 22, dans laquelle ladite molécule de marquage est choisie parmi la biotine, les dérivés de la biotine, une fluorescéine, les dérivés de la fluorescéine et toute autre molécule de marquage qui peut être couplée à ladite chimiokine par ledit procédé.

24. Chimiokine selon la revendication 22 ou 23, ladite chimiokine étant choisie parmi IL-8, GRO α , β ,

5 ZNA-78, NAP-2, IP-10, MIG, SDF-1, MIP -1 α , MIP -1 β ,
10 1, RANTES, MCP-3, Eotaxine, Lymphotactine, GRO.

25. Chimiochine selon la revendication 22 ou 23,
5 ladite chimiochine étant RANTES.

26. Chimiochine selon la revendication 25 dans
15 laquelle RANTES est marqué en position 1, 25, 33, 45,
ou 67.

27. Chimiochine selon la revendication 25, dans
20 laquelle RANTES est modifiée de manière à comporter en
position 67, une lysine, ou une cystéine ou d'autres
acides aminés adaptés pour un couplage à la molécule de
15 couplage.

28. Chimiochine selon l'une quelconque des
25 revendications 22 à 27, dans laquelle la chimiochine est
couplée avec une biotine.

29. Composition comprenant une chimiochine marquée,
30 caractérisée en ce que ladite composition comprend, de
manière homogène et au choix, une, ou plusieurs,
chimiochine(s) marquée(s) selon l'une quelconque des
35 revendications 22 à 28.

30. Composition comprenant une chimiochine marquée,
40 caractérisée en ce que ladite composition comprend de
manière homogène et au choix une chimiochine marquée,
ladite chimiochine marquée étant RANTES dans lequel la
position 67 a été remplacée par une lysine, ladite
45 chimiochine étant couplée à la biotine.

31. Trousse d'analyse d'un récepteur et/ou d'une
50 molécule d'adhésion d'une chimiochine, caractérisée en

090812554

41

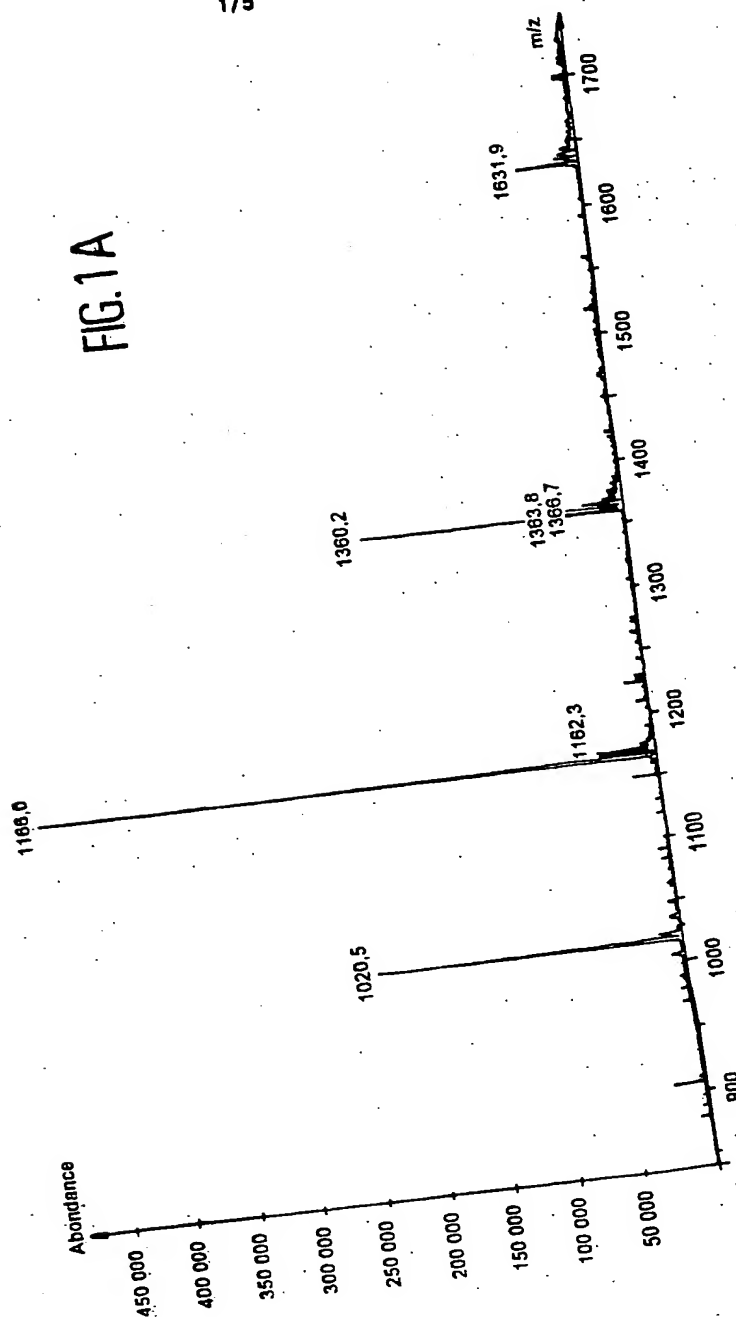
5 qu'elle comprend une composition selon la
10 revendication 29 ou 30.

15 32. Trousse selon la revendication 31, comprenant
20 en outre un réactif adéquat permettant de détecter la
chimiochine marquée de ladite composition, ledit réactif
étant choisi en fonction de la molécule de marquage de
la chimiochine.

25 33. Trousse selon la revendication 31, dans
laquelle la chimiochine étant marquée par une biotine,
ladite troussse comprend en outre de l'avidine ou de la
streptavidine.

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 1A



BEST AVAILABLE COPY

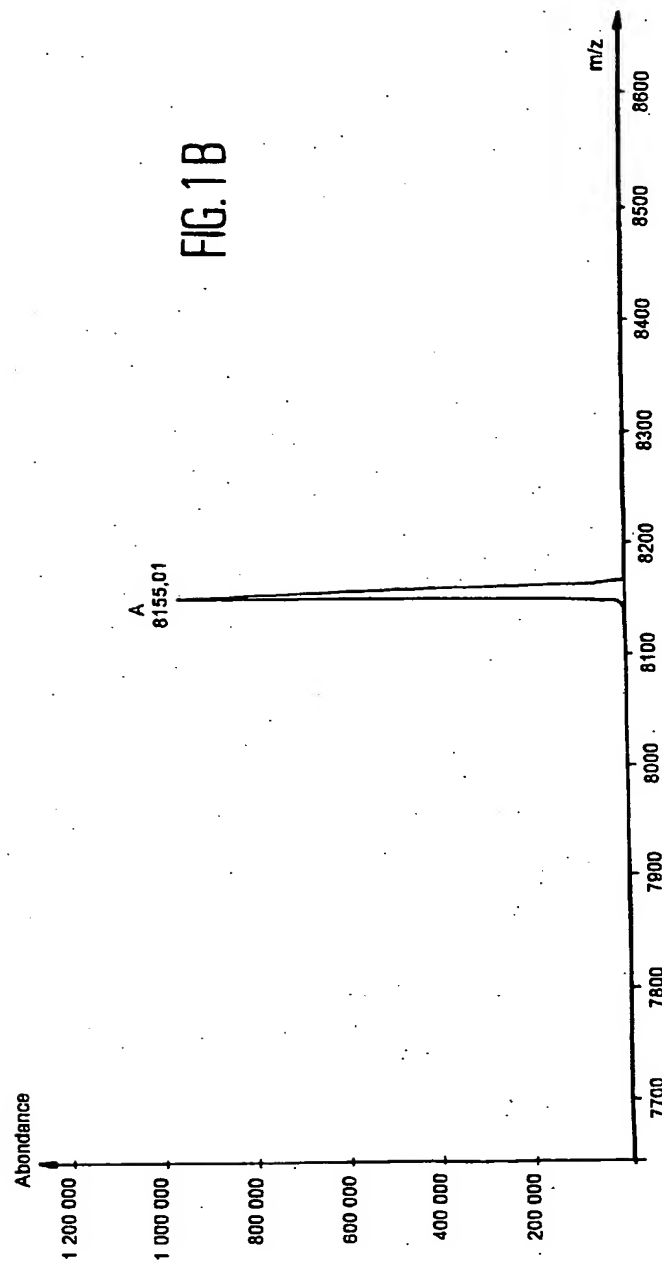


FIG. 1B

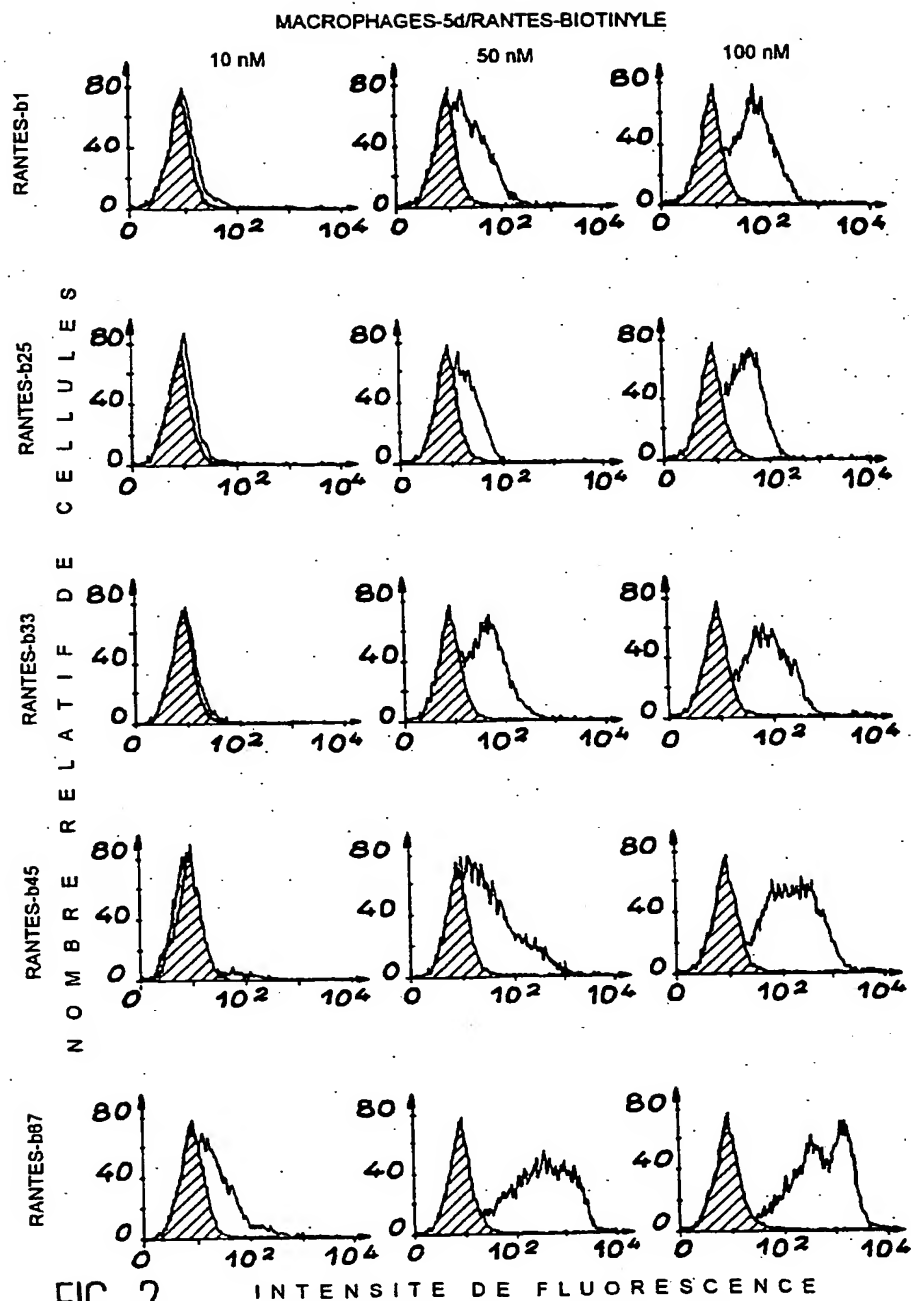


FIG. 2

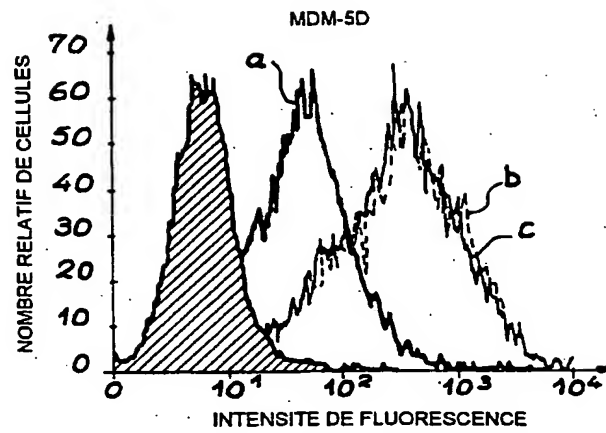


FIG. 3 A

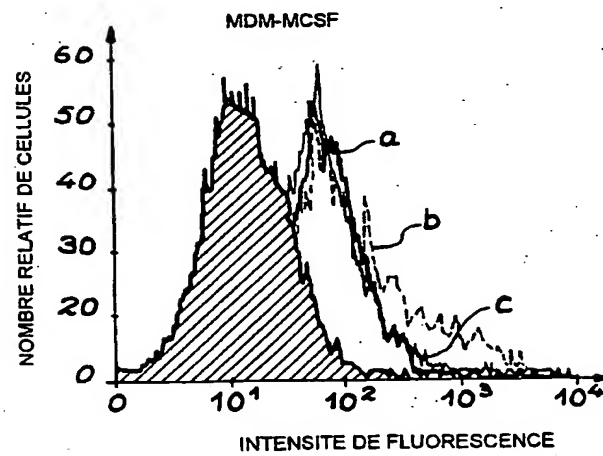
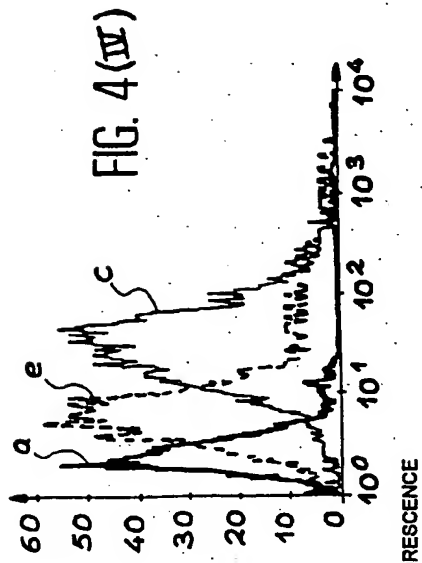
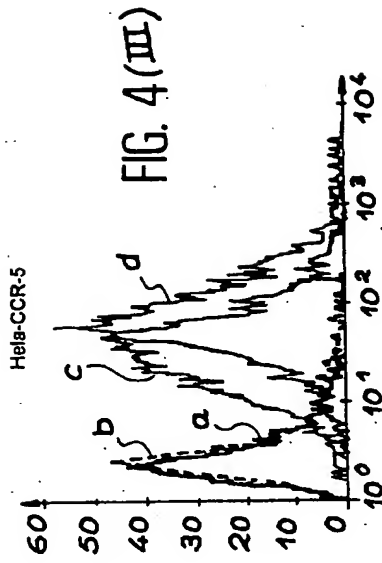
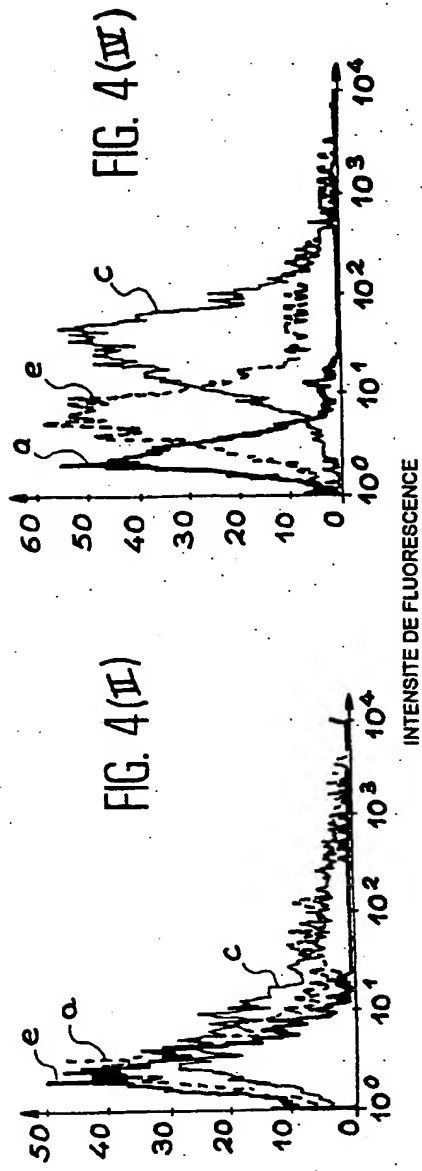
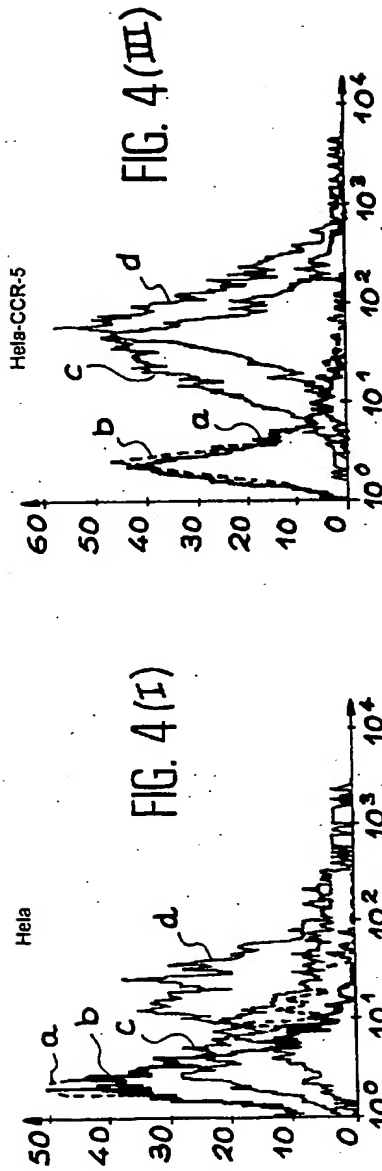


FIG. 3 B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/52 C07K1/13 G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 09171 A (BERKHOUT THEO ;GROOT PIETER HENDRIK EVERT (GB); SMITHKLINE BEECHAM) 5 March 1998 (1998-03-05)	1-10, 12-16, 19-21
X	page 4, line 20 - line 25; claim 7 page 15, paragraph 6.2	22-25, 28, 29, 31-33
Y	US 5 780 268 A (SEILHAMER JEFFREY J ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14)	1-10, 12-16, 19-21
X	column 4, line 22 - line 30 column 17, line 42 - line 60	22-25, 28, 29, 31-33
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Δ" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 1999

Date of mailing of the international search report

07/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02055

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 310 136 A (UNIV ROCKEFELLER) 5 April 1989 (1989-04-05)	1-10, 12-16, 19-21
X	page 6, line 10	22-25, 28, 29, 31-33
Y	WO 97 31655 A (CASORATI GIULIA ;CORTI ANGELO (IT); DELLABONA PAOLO (IT); PELAGI M) 4 September 1997 (1997-09-04)	1-10, 12-16, 19-21
X	page 11, last paragraph	22-25, 28, 29, 31-33
Y	WO 98 01757 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH ;DERBYSHIRE ELAINE JOY (GB); JOHNSON KEVIN) 15 January 1998 (1998-01-15)	1-10, 12-16, 19-21
X	abstract	22-25, 28, 29, 31-33
Y	US 5 605 671 A (STRIETER ROBERT M ET AL) 25 February 1997 (1997-02-25)	1-10, 12-16, 19-21
X	column 2, paragraph 1	22-25, 28, 29, 31-33
Y	RIVERA BAEZA C ET AL: "ORTHOGONAL SOLID-PHASE SYNTHESIS OF A MONOBIOTINYLATED ANALOG OF NEUROPEPTIDE Y" INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE AND PROTEIN RESEARCH, vol. 39, no. 3, 1 March 1992 (1992-03-01), pages 195-200, XP000264168 abstract; figure 2	1-10, 12-16, 19-21
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 10, 8 September 1997 (1997-09-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 136059, CHERSI, ALBERTO ET AL: "Selective 'in synthesis' labeling of peptides by fluorochromes" XP002123712 abstract & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1997), 1336(1), 83-88 CODEN: BBACAQ;ISSN: 0006-3002,1997,	1-10, 12-16, 19-21
	-/--	

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02055

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LELIEVRE D ET AL: "On-Line Solid-Phase Synthesis of a Peptide B1-Derivatized with Biotin and 4-Azido Salicylic Acid" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 36, no. 51, 18 December 1995 (1995-12-18), page 9317-9320 XP004026744 abstract; figure 1	1-10, 12-16, 19-21
Y	MAGAZINE H I ET AL: "EVALUATION OF ENDOTHELIN RECEPTOR POPULATIONS USING ENDOTHELIN-1 BIOTINYLATED AT LYSINE-9 SIDECHAIN" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 181, no. 3, 31 December 1991 (1991-12-31), pages 1245-1250, XP002029500 page 1246, paragraph 4	1-10, 12-16, 19-21

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/FR 99/02055

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9809171	A	05-03-1998	NONE	
US 5780268	A	14-07-1998	NONE	
EP 0310136	A	05-04-1989	AT 149176 T AU 2333688 A DE 3855802 D DE 3855802 T EP 0761685 A ES 2100839 T GR 3022689 T JP 10185899 A US 5650147 A US 5616688 A US 5703206 A US 5849873 A US 5741484 A US 5863535 A US 5942222 A US 5760186 A US 5817763 A US 5145676 A	15-03-1997 27-07-1989 03-04-1997 12-06-1997 12-03-1997 01-07-1997 31-05-1997 14-07-1998 22-07-1997 01-04-1997 30-12-1997 15-12-1998 21-04-1998 26-01-1999 24-08-1999 02-06-1998 06-10-1998 08-09-1992
WO 9731655	A	04-09-1997	IT M1960358 A AU 1769497 A CA 2247308 A EP 0885015 A	27-08-1997 16-09-1997 04-09-1997 23-12-1998
WO 9801757	A	15-01-1998	AU 3452797 A CA 2259421 A EP 0906571 A GB 2315125 A,B GB 2330909 A	02-02-1998 15-01-1998 07-04-1999 21-01-1998 05-05-1999
US 5605671	A	25-02-1997	US 5413778 A US 5346686 A AT 150977 T AU 674039 B AU 5403294 A CA 2145983 A DE 69309479 D EP 0662843 A JP 8502075 T WO 9407542 A AU 686119 B AU 5353194 A CA 2146239 A EP 0670736 A JP 8511765 T WO 9407535 A	09-05-1995 13-09-1994 15-04-1997 05-12-1996 26-04-1994 14-04-1994 07-05-1997 19-07-1995 05-03-1996 14-04-1994 05-02-1998 26-04-1994 14-04-1994 13-09-1995 10-12-1996 14-04-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des. internationale No
PCT/FR 99/02055

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K14/52 C07K1/13 G01N33/533

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 98 09171 A (BERKHOUT THEO ;GROOT PIETER HENDRIK EVERT (GB); SMITHKLINE BEECHAM) 5 mars 1998 (1998-03-05)	1-10, 12-16, 19-21
X	page 4, ligne 20 - ligne 25; revendication 7	22-25, 28,29, 31-33
	page 15, alinéa 6.2	
Y	US 5 780 268 A (SEILHAMER JEFFREY J ET AL) 14 juillet 1998 (1998-07-14)	1-10; 12-16, 19-21
X	colonne 4, ligne 22 - ligne 30	22-25, 28,29, 31-33
	colonne 17, ligne 42 - ligne 60	

	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" documents particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/12/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cervigni, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Det. e internationale No
PCT/FR 99/02055

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 310 136 A (UNIV ROCKEFELLER) 5 avril 1989 (1989-04-05)	1-10, 12-16, 19-21
X	page 6, ligne 10	22-25, 28,29, 31-33
Y	WO 97 31655 A (CASORATI GIULIA ;CORTI ANGELO (IT); DELLABONA PAOLO (IT); PELAGI M) 4 septembre 1997 (1997-09-04)	1-10, 12-16, 19-21
X	page 11, dernier alinéa	22-25, 28,29, 31-33
Y	WO 98 01757 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH ;DERBYSHIRE ELAINE JOY (GB); JOHNSON KEVIN) 15 janvier 1998 (1998-01-15)	1-10, 12-16, 19-21
X	abrégé	22-25, 28,29, 31-33
Y	US 5 605 671 A (STRIETER ROBERT M ET AL) 25 février 1997 (1997-02-25)	1-10, 12-16, 19-21
X	colonne 2, alinéa 1	22-25, 28,29, 31-33
Y	RIVERA BAEZA C ET AL: "ORTHOGONAL SOLID-PHASE SYNTHESIS OF A MONOBIOTINYLATED ANALOG OF NEUROPEPTIDE Y" INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE AND PROTEIN RESEARCH, vol. 39, no. 3, 1 mars 1992 (1992-03-01), pages 195-200, XP000264168 abrégé; figure 2	1-10, 12-16, 19-21
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 10, 8 septembre 1997 (1997-09-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 136059, CHERSI, ALBERTO ET AL: "Selective 'in synthesis' labeling of peptides by fluorochromes" XP002123712 abrégé & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1997), 1336(1), 83-88 CODEN: BBACAO;ISSN: 0006-3002,1997,	1-10, 12-16, 19-21

	-/-	

1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la dernière feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No
PCT/FR 99/02055

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	LELIEVRE D ET AL: "On-Line Solid-Phase Synthesis of a Peptide Bi-Derivatized with Biotin and 4-Azido Salicylic Acid" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 36, no. 51, 18 décembre 1995 (1995-12-18), page 9317-9320 XP004026744 abrégé; figure 1	1-10, 12-16, 19-21
Y	MAGAZINE H I ET AL: "EVALUATION OF ENDOTHELIN RECEPTOR POPULATIONS USING ENDOTHELIN-1 BIOTINYLATED AT LYSINE-9 SIDECHAIN" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 181, no. 3, 31 décembre 1991 (1991-12-31), pages 1245-1250, XP002029500 page 1246, alinéa 4	1-10, 12-16, 19-21

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Donnée internationale No
PCT/FR 99/02055

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9809171 A	05-03-1998	AUCUN	
US 5780268 A	14-07-1998	AUCUN	
EP 0310136 A	05-04-1989	AT 149176 T AU 2333688 A DE 3855802 D DE 3855802 T EP 0761685 A ES 2100839 T GR 3022689 T JP 10185899 A US 5650147 A US 5616688 A US 5703206 A US 5849873 A US 5741484 A US 5863535 A US 5942222 A US 5760186 A US 5817763 A US 5145676 A	15-03-1997 27-07-1989 03-04-1997 12-06-1997 12-03-1997 01-07-1997 31-05-1997 14-07-1998 22-07-1997 01-04-1997 30-12-1997 15-12-1998 21-04-1998 26-01-1999 24-08-1999 02-06-1998 06-10-1998 08-09-1992
WO 9731655 A	04-09-1997	IT MI960358 A AU 1769497 A CA 2247308 A EP 0885015 A	27-08-1997 16-09-1997 04-09-1997 23-12-1998
WO 9801757 A	15-01-1998	AU 3452797 A CA 2259421 A EP 0906571 A GB 2315125 A, B GB 2330909 A	02-02-1998 15-01-1998 07-04-1999 21-01-1998 05-05-1999
US 5605671 A	25-02-1997	US 5413778 A US 5346686 A AT 150977 T AU 674039 B AU 5403294 A CA 2145983 A DE 69309479 D EP 0662843 A JP 8502075 T WO 9407542 A AU 686119 B AU 5353194 A CA 2146239 A EP 0670736 A JP 8511765 T WO 9407535 A	09-05-1995 13-09-1994 15-04-1997 05-12-1996 26-04-1994 14-04-1994 07-05-1997 19-07-1995 05-03-1996 14-04-1994 05-02-1998 26-04-1994 14-04-1994 13-09-1995 10-12-1996 14-04-1994